

Resistens mot grönmögel hos äpple

HILDE NYBOM, MASOUD AHMADI-AFZADI OCH IBRAHIM TAHIR

Äpple är gott och nyttigt, och allt fler konsumenter frågar efter svensk frukt i affärerna. Men tillgången är inte så stor eftersom svenska odlare endast producerar 20% av de äpplen vi äter i Sverige. Resten importeras från utlandet, där klimatet är gynnsammare, arbetskostnaderna lägre och tillgången på tillåtna växtskyddsmedel större. Konsumenterna är kanske beredda att betala lite extra för svensk frukt men man förväntar sig då att kvaliteten ska vara på topp: vackra, friska och välsmakande frukter!

Dessvärre finns det många olika problem som kan drabba ett äppleträd och dess frukt. Skador, som inte blir synliga förrän frukten redan skördats och placerats i kylskåp i väntan på försäljning, orsakar ett kännbart ekonomiskt avbräck för odlarna. Det kan vara både fysiologiska problem och lagringsrötter som orsakas av olika svampar (Tahir 2012, 2014). I Mellaneuropa har lagringsrötterna ökat under senare år, vilket sannolikt är en effekt av klimatförändringen. Vi kan alltså förvänta oss att sådana angrepp kommer att bli ännu allvarigare efterhand som klimatet i Sverige blir allt varmare och fuktigare.

Hälsofarlig frukt!

En av de vanligare lagersvamparna är grönmögel (*Penicillium expansum*) som främst angriper skadad frukt (Figur 1). Även en mycket liten skada kan snabbt infekteras vilket leder till att hela frukten ruttnar. Än värre är dock att denna svamp producerar flera giftiga ämnen, som exempelvis patulin. Nyligen rapporterade Råd



Fig. 1 Grönmögel på äpple. Foto: M. Ahmadi-Afzadi.

och Rön (www.radron.se/tester/mat-halsa--skonhet/appeljuice) om analyser där 9 av 12 olika märken av utlandsproducerad äppeljuice (från koncentrat) uppvisade mätbara halter av patulin. I ett par fall överskreds det rekommenderade gränsvärdet för barn.

Utomlands motverkar man oftast svampangreppen genom frikostig behandling med kemiska växtskyddsmedel, både på fält och efter skörd genom att man doppar eller sprayar frukten. I Sverige får man inte använda dylika växtskyddsmedel efter skörd. Även användningen innan skörd (dvs. besprutning av träd på fält) har blivit alltmer begränsad, med speciell uppmärksamhet på odlingar belägna på vattenskyddsområden. För konsumenterna är dessa restriktioner förstas av godo: exponeringen för resthalter av växtskyddsmedel är bara en sjun-

dedel så hög för en konsument som äter svenska frukter, bär och grönsaker jämfört med för en konsument som äter importerade varor (Beckman 2015).

Inom ekologisk odling är problemen för odlaren med grönmögel och de andra svamparna ännu mer betungande eftersom det inte finns några kemiska medel som är godkända för att motverka lagersjukdomar. Detta leder i sin tur till att resthalten av växtskyddsmedel blir nästan försumbar i ekologiskt odlade frukter, bär och grönsaker.

Friskare äpplesorter

Alla äpplesorter är inte lika mottagliga för lagersvamparna. Genom att välja sorter med speciellt god motståndskraft, skulle odlaren kunna odla miljövänligare men med bibehållen lönsamhet – förutsatt att det finns



Fig. 2. Analys av fruktens hårdhet med hjälp av en penetrometer, inokulering av äpple med sporer av grönmögel, inokulerad och lagrad frukt av 'Siv' med symptom av grönmögel.



resistenta sorter med samma avkastning och kvalitet som hos de vanliga sorterna i svensk odling. Hittills har detta inte fått så stort utrymme inom växtförädlingsforskningen, och några resistensgener har inte identifierats. Att hitta en enda, enkelt nedärvd gen, som ger totalt skydd, är heller inte realistiskt. Troligen finns det i stället ett antal olika faktorer, som tillsammans avgör graden av motståndskraft, till exempel egenskaper som påverkar fruktens kemiska innehåll och fruktköttets och skalets utformning.

På Balsgård vid Institutionen för växtförädling startade vi ett nytt projekt 2010 om lagersjukdomar hos äpple, med fokus på just grönmögel. Målsättningen var att identifiera speciellt motståndskraftiga sorter för användande inom praktisk växtförädling, samt att ta reda på hur denna motståndskraft är uppbyggd och hur den nedärvs. Det första steget i projektet var att undersöka hur mycket olika äpplesorter skiljer sig åt i nedärvd motståndskraft mot angrepp av svampen.

Inokulering av äpplen

En utvärdering av spontant uppkomna svampangrepp förutsätter dels att man har väldigt mycket frukt som behandlats exakt likadant, och dels att infektionerna blir kraftfulla under just de år man gör sina analyser. För att få säkrare resultat, brukar vi i

stället inokulera frukten med sporer av grönmögel (Ahmadi-Afzadi m.fl. 2013, Tahir m.fl. 2015) (Figur 2). Vi injicerar 20 mikroliter av sporlösningen med en pipett, som sticks in ca 4 mm i frukten. Varje frukt inokuleras på två sidor, och förvaras sedan i rumstemperatur tills att sporlösningen torkat in. För varje sort inokulerar vi vanligen 45 frukter. Dessa flyttas sedan över i vanligt kylskåp (+3 °C). När lagringsperioden är över (6 veckor för tidigmognande sorter och 10–12 veckor för senmognande), mäter vi storleken på den uppkomna skadan som vanligen bildar en rund fläck kring inokuleringspunkten. Ju mindre skada, ju mer motståndskraftig sort. Hittills har vi inokulerat frukt från cirka 200 olika äpplesorter, varav merparten under minst två säsonger. I ett nordiskt samarbetsprojekt (ppp-apples.nordgen.org), har en del äpplesorter inokulerats även i Njøs på norska västkusten där Graminor bedriver ett växtförädlingsprogram (Nybom m.fl., under tryckning).

Sorterna skiljer sig åt

Som ett mått på den enskilda sortens mottaglighet har vi använt den genomsnittliga diametern på svampskadan dividerat med antal veckor i kylskåp. Olika sorter skiljer sig åt signifikant när man analyserar erhållna data med statistiska metoder (Ahmadi-Afzadi

m.fl. 2013, Tahir m.fl. 2015). De mest motståndskraftiga sorterna får ljusbruna fläckar med en diameter på högst 1–2 cm medan de känsligaste sorterna får stora insjunkna fläckar med en diameter på 8–10 cm och kraftig sporbildning. Två sorter, som tagits fram i växtförädlingsprogrammet på Balsgård, Katja och Brigit Bonnier, hör till de mest motståndskraftiga liksom exempelvis Ringstad från Danmark, Gloster från Tyskland, Pepin Schafranovij från Ryssland och Mutsu från Japan. Extremt låg mottaglighet visade den i Norge testade kinesiska sorten Fu Shuai, som därmed borde vara extra intressant för växtförädling och fortsatt forskning. Merparten av de gamla lokalsorterna har i stället visat sig vara mycket känsliga.

Motståndskraften styrs nog i hög grad av fruktens inre egenskaper, som exempelvis mängden av mognadshormonet etylen samt cellväggarnas utformning. Tidigmognande sorter blir oftare hårt angripna av grönmögel jämfört med senmognande sorter. Detsamma gäller för sorter som har relativt mjukt och löst fruktkött vid skördetillfället, dvs. flertalet av de tidigmognande sorterna liksom även många av de gamla lokalsorterna. Även sorter som tappar mycket av sin ursprungliga fasthet under lagringsperioden, visade jämförelsevis stor mottaglighet för grönmögel.

Kemiskt innehåll

Fruktens innehåll av olika kemiska ämnen påverkar mottagligheten för diverse problem, och hit hör nog även infektion och tillväxt av grönmögel under lagringsperioden. Mängden av äpplesyra samt 10 olika fenolämnen undersöktes därför i både skal och fruktkött av 24 äpplesorter (Ahmadi-Afzadi m.fl. 2015) (Figur 3). Såväl friska frukter som frukter som inokulerats med grönmögel var med i dessa analyser. Både totalmängden fenoler och mängden av vissa individuella fenolämnen, som flavonoler och procyanidin 2 i inokulerad frukt, visade stark korrelation med motståndskraften hos de undersökta sorterna. Uppenbarligen kan alltså ett jämförelsevis högt innehåll av dessa ämnen bidra med ett visst skydd mot grönmögel. Även vad gäller andra svampsjukdomar tycks en förhöjd halt av olika fenolämnen kunna bidra till ökad motståndskraft.

DNA-markörer

Tillgång till DNA-markörer, som kan skilja på mottagliga och motståndskraftiga äpplesorter, är värdefullt vilken sjukdom det än vara må. Speciellt värdefullt blir det förstås när sjukdomskänsligheten är svår och/eller tidsödande att kvantifiera, som för grönmögel. Tyvärr har man ännu inte framställt några DNA-markörer med förmåga att identifiera skillnader i mottagligheten för just denna svamp.

Inom det internationella forskningsprojektet Fruitbreedomics har nyligen mer än 1000 äpplesorter analyserats för närmare 400.000 DNA-markörer (SNP = single nucleotide polymorphism). Detta är en potentiell skattkammare för framtida genetisk forskning! Hittills har man identifierat gener för blomnings-tid och fruktmognad med hjälp av dessa markörer enligt en metod som kallas 'Genome wide association study' (GWAS) (Muranty m.fl., under tryckning). Men man kan hitta gener för i princip vilken egenskap som helst förutsatt att man har data

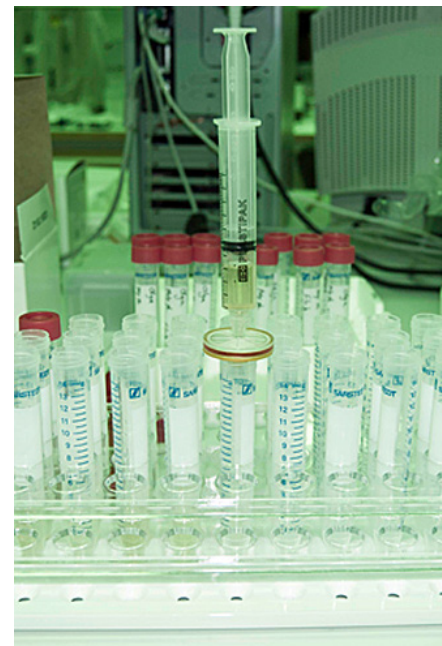
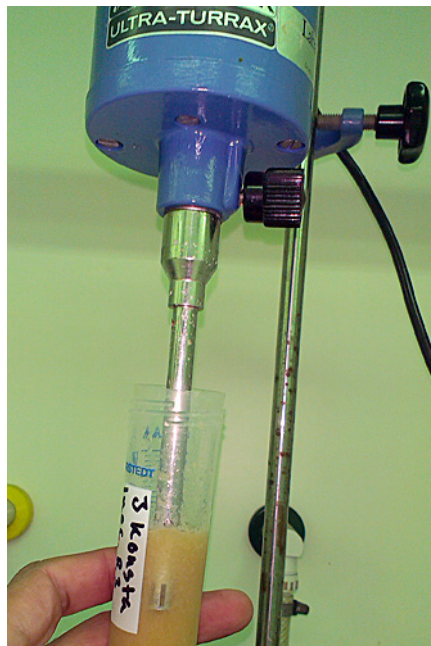


Fig. 3 Beredning av fruktkött för kemiska analyser, filtrering av extrakt inför analys med HPLC (high-performance liquid chromatography)

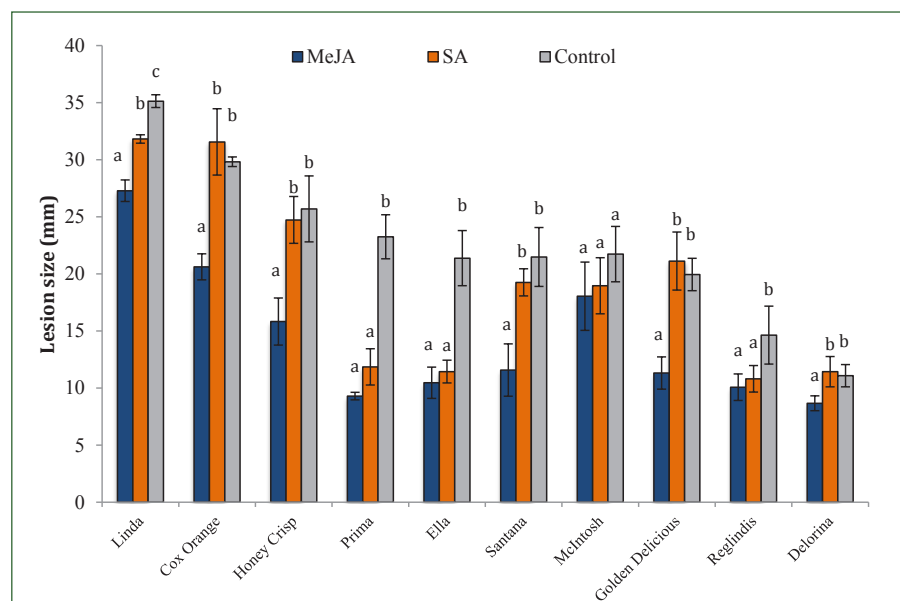


Fig. 4 Diameter för erhållna symptom av grönmögel hos inokulerad frukt av 10 äpplesorter, som sprayats med metyljasmonat (MeJA) eller salicylsyra (SA) respektive endast inokulerats (Control)

för just den egenskapen hos ett antal sorter. Vi jämförde grönmögel-data för drygt 200 äpplesorter med samma sorters SNP-markörer. Tyvärr fick vi inget napp, men vi hade troligen för lite data. Just nu arbetar vi med att inokulera ännu fler äpplesorter,

och sedan kommer vi att göra nya GWAS-analyser i hopp om att identifiera en eller flera SNP-markörer som är korrelerade med graden av mottaglighet för grönmögel.

Jakten på gener

Vi har även angripit problemet med gener för motståndskraft mot grönmögel med en metod som kallas 'reverse transcriptomics'. Här försöker man identifiera viktiga gener genom att analysera sortskillnader i förekomsten av DNA-sekvenser som uttrycks aktivt vid provtagningstillfället. I ett samarbetsprojekt med forskningsorganisationen INRA i Angers, Frankrike, har vi hybridiserat aktivt uttryckt DNA från fyra äpplesorter med 60.000 tidigare isolerade DNA-sekvenser från potentiella äpplegener (Ahmadi-Afzadi 2015). Två av sorterna är relativt mottagliga för grönmögel och övriga två är relativt motståndskraftiga. Dessutom använde vi DNA både från friska frukter och från frukter som inokulerats med grönmögel. När vi utvärderar resultatet av hybridiseringen, kan vi se vilka av de 60.000 äpple DNA-sekvenserna som är aktiva i vart och ett av våra äppleprover. Analysarbetet fokuseras på sådana gener som skiljer dels mellan friska och inokulerade frukter, och dels mellan mottagliga och motståndskraftiga sorter.

Vi har på detta sätt identifierat många gener, som är betydligt mer aktiva hos de motståndskraftiga sorterna jämfört med de mottagliga sorterna en vecka respektive 6 veckor efter att frukten har inokulerats med grönmögel. Flera av dessa gener är aktiva inom uppbyggnaden av cellväggar, och dessa kan alltså antas ha stor betydelse för olika äpplesorters förmåga att motstå svampens angrepp. Andra intressanta gener är inblandade i exempelvis tillverkningen

av fenolämnen samt växthormonet metyljasmonat (MeJa). Betydelsen av detta hormon verifierade vi sedan genom att inokulera frukter av 10 äpplesorter och sedan spraya hälften av dem med MeJa (Figur 4). För 9 sorter hade de MeJa-sprayade frukterna signifikant mindre symptom av grönmögel än frukt som inte hade sprayats.

Referenser

- Ahmadi-Afzadi M, Tahir I, Nybom H. 2013. Impact of harvesting time and fruit firmness on the tolerance to fungal storage diseases in an apple germplasm collection. *Postharvest Biol. Technol.* 82: 51–58
- Ahmadi-Afzadi M. 2015. Genetic variation in resistance to fungal storage diseases in apple. *Inoculation-cased screening, transcriptomics and biochemistry*. Akademisk avhandling, 2015:18, SLU, <http://pub.epsilon.slu.se/11903>
- Ahmadi-Afzadi M, Nybom H, Ekholm A, Tahir I, Rumpunen K. 2015. Biochemical contents of apple peel and flesh affect level of partial resistance to blue mold. *Postharvest Biol. Technol.* 110: 173–182
- Beckman K. 2015. Exponering för resthalter av pesticider i konventionellt odlade frukter, bär och grönsaker inom EU och i tredje land jämfört med konventionellt odlade i Sverige samt ekologiskt odlade. Examensarbete, SLU, <http://www.slu.se/Documents/externwebben/centrumbildningar-projekt/epok/Examensarbete%20-%20Katari-na%20Beckman%20PDEpdf>
- Muranty H, Urrestarazu J, Denancé

- C, Leforestier D, Ravon E, Guyader A, Guisnel R, Feugey L, Tartarini S, Dondini L, Gregori R, Lateur M, Houben P, Sedlak J, Paprstein F, Ordidge M, Nybom H, Garkava-Gustavsson L, Troggio M, Bianco L, Velasco R, Poncet C, Théron A, Bink MCAM, Laurens F, Durel C-E. *Genome Wide Association Study of two phenology traits (flowering time and maturity date) in apple*. *Acta Horticult.*, under tryckning.
- Nybom H, Røen D, Karhu S, Garkava-Gustavsson L, Tahir I, Haikonen T, Røen K, Ahmadi-Afzadi M, Ghasemkhani M, Sehic J, Hjeltne S-H. *Prebreeding for future challenges in Nordic apples; susceptibility to fruit tree canker and storage diseases*. *Acta Horticult.*, under tryckning.
- Tahir I. 2012. Framtagning av optimala skördetidspunkten och ULO-lagringsbetingelser för några äpplesorter. SLU Landskap Trädgård Jordbruk, Rapportserie 2012:24, 19 s, <http://pub.epsilon.slu.se/9283>
- Tahir I. 2014. Vad är det som förtär äpple under lagring? SLU Landskapsarkitektur Trädgård Växtproduktionsvetenskap, Rapportserie 2014:14, 34 s, <http://pub.epsilon.slu.se/11224>
- Tahir I, Nybom H, Ahmadi-Afzadi M, Røen K, Sehic J, Røen D. 2015. Susceptibility to blue mold caused by *Penicillium expansum* in apple cultivars adapted to a cool climate. *Europ. J. Horticult. Sci.* 80: 117–127, <http://pubhort.org/ejhs/80/3/4/index.htm>

Faktabladet är utarbetat på LTV-fakultetens Institution för Växtförädling, Balsgård
www.slu.se/balsgard

Projektet har finansierats av FORMAS, Einar och Inga Nilssons stiftelse samt
Nordic Public-Private Partnership for prebreeding.

Projektansvarig: Hilde Nybom, hilde.nybom@slu.se

<http://epsilon.slu.se>